

# 四塩化炭素投与による肝障害ラットの間脳内 5 $\alpha$ -reductase 活性と血漿テストステロン

金 行 孝 雄

## はじめに

1960年代の前半までは、中枢神経系での性ホルモンの役割はコナドトロピンの分泌調節に関与すること以外は注目を集めなかった。しかし、1966年に Sholiton ら<sup>1)</sup> がラット脳を使用した *in vitro* の実験でテストステロンが $\Delta^4$ -アンドロステンダイオンに変換することを報告した。以来、脳での性ホルモン代謝は関心を持たれ、数多くの報告がなされた。しかし、性ホルモンの役割についての報告は性に関することがらがほとんどである。

著者はラット脳を使用した実験で、テストステロンの代謝に関係する酵素；17 $\beta$ -hydroxy-steroid : NADP 17 $\beta$ -oxidoreductase (E. C. I. 1. 1. 64)<sup>2)</sup>, 3-oxo-5 $\alpha$ -steroid : (acceptor)  $\Delta^4$ -oxidoreductase (E. C. I. 3. 99. 5)<sup>3)</sup> (以下 5 $\alpha$ -reductase と略す) 及び 3 $\alpha$ -hydroxysteroid : NADP oxidoreductase (E. C. I. 1. 1. 50)<sup>4)</sup> が存在することを確認した。

ラットの睪丸及び副腎を剔除し、体液中のテストステロンを枯渇させて間脳内 5 $\alpha$ -reductase 活性を測定すると、術後3日目まで増加し、この時、テストステロンプロピオネートを投与すると正常ラットの活性値に回復することを報告した<sup>5)</sup>。

ヒトの慢性肝硬変症において血中テストステロンが減少する<sup>6,7)</sup>。そこで、本論文でラットに四塩化炭素を用いて肝障害を誘発し、体液中のテストステロンを減少させ、間脳内 5 $\alpha$ -reductase 活性を測定したので報告する。

## 実験材料及び実験方法

### 1 実験動物

ウィスター系雄ラットを用いた。飼育条件は温度 23 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C, 湿度 55 $\pm$ 1%, 12時間毎に変る明暗サイクルに調節した部屋で飼育した。ラット飼育用固型飼料と水を自由に摂取させた。実験開始時の体重は 150 g 前後のものをグループ飼育した。

### 2 肝障害ラットの作製

実験Ⅰはラットに四塩化炭素 (0.1 ml/150 g 体重) を1日1回2日間投与し、最終投与の1, 3, 5及び7日後に断頭により殺した。

実験Ⅱはラットに四塩化炭素 (0.1 ml/150 g 体重) を2日、4日及び6日間投与し、最終投与の24時間後に断頭により殺した。

実験Ⅲはラットに四塩化炭素 (0.05 ml/150 g 体重) を1日目、4日目、7日目、11日目、14日目及び21日目に投与し、最初の投与から28日目に断頭により殺した。

### 3 試料の調整

ラットは無麻酔下に断頭した後、ただちに全脳を冷却生理食塩水中に取り出し、軟膜及び血管を取り除き、間脳は Schubert ら<sup>8)</sup> の方法により分離した。分離した間脳は9倍量のリン酸塩系緩衝液 (pH 6.8) を加え polytron (Kinematica, Switzerland) ホモジナイザーでホモジナイズした。たんぱく質量は Lowry ら<sup>9)</sup> の方法で測定した。

血液は頸部の切り口よりヘパリンナトリウムの入った試験管に採取し、血漿を分離した。分

離した血漿はテストステロンの測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 4 間脳内 $5\alpha$ -reductase 活性の測定法

$5\alpha$ -reductase 活性の測定は前報の方法<sup>9)</sup>に従って行った。

$5\alpha$ -reductase 活性は  $4\cdot^{14}\text{C}$ -テストステロンと間脳ホモジネートを NADPH の存在下でインクベーションした後、分離した代謝産物 ( $4\cdot^{14}\text{C}$ - $5\alpha$ -ダイハイドロテストステロンと  $4\cdot^{14}\text{C}$ - $5\alpha$ -アンドロスタン- $3\alpha$ ,  $17\beta$ -ダイオール) の合計から pmoles/mgたんぱく質 / 2時間として表わした。

#### 5 血漿テストステロンの測定法

血漿テストステロンの測定はミドリ十字のテストステロンラジオイムノアッセイ用キットを用い、ラジオイムノアッセイ法で行った<sup>10)</sup>。

同一ラット血漿を用いて行ったテストステロンの測定において internal value は  $1.85 \pm 0.11\text{ng/ml}$  血漿 (mean  $\pm$  s. d, N=4, 変動係数 5.9%) であった。

### 実験結果

実験 I においては、ラット間脳内  $5\alpha$ -reductase 活性は無処置群と比較して四塩化炭素投与後 1 日目群で 22% ( $P < 0.05$ ) 増加し、7 日目群で 25% ( $P < 0.02$ ) 減少した。血漿テストステロンは無処置群と比較して四塩化炭素投与後 1 日目群で 67% ( $P < 0.001$ )、3 日目群で 16%、5 日目群で 42% ( $P < 0.01$ ) 及び 7 日目群で 24% ( $P < 0.05$ ) 減少した (表 1)。

表 1 急性肝障害ラットの間脳内  $5\alpha$ -reductase 活性と血漿テストステロンの経時変化

Days after administration of $\text{CCl}_4$	$5\alpha$ -Reductase activity (pmoles/mg protein $\cdot$ 2 hr)	Testosterone (ng/ml plasma)
Control	$38.9 \pm 7.2$	$2.98 \pm 1.18$
1	$47.3 \pm 9.3$ *	$0.98 \pm 1.38$ ****
3	$35.6 \pm 8.1$	$2.51 \pm 1.99$
5	$37.0 \pm 9.8$	$1.74 \pm 2.02$ ***
7	$29.2 \pm 7.8$ **	$2.26 \pm 1.66$ *

$4\cdot^{14}\text{C}$ -テストステロン (specific activity  $53.5\text{ mCi/m mol}$ . The Radiochemical Centre) 365,200 カウントを基質とし、NADPH 252 n moles, 間脳ホモジネート (蛋白質量約 8 mg) 及び pH 6.8 リン酸塩緩衝液を加えて全量を 2.5 ml とし、 $38^{\circ}\text{C}$ 、2 時間インクベートした。

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.02$ , \*\*\*  $P < 0.01$  及び \*\*\*\*  $P < 0.001$ . (Student's t-test) 対照群と比較した。実験例数 = 9、実験値 = mean  $\pm$  s. d.

実験 II においては、ラット間脳内  $5\alpha$ -reductase 活性は無処置群と比較して四塩化炭素 2 日投与群で 22% ( $P < 0.05$ ) 増加した。血漿テストステロンは無処置群と比較して四塩化炭素 2 日投与群で 67% ( $P < 0.001$ )、4 日投与群で 33.2% ( $P < 0.02$ ) 及び 6 日投与群で 83.8% ( $P < 0.001$ ) 減少した (表 2)。

表2 四塩化炭素の連続投与がラット間脳内 5 $\alpha$ -reductase 活性と血漿テストステロンに及ぼす影響

Days of CCl <sub>4</sub> administration	5 $\alpha$ -Reductase activity (pmoles/mg protein·2hr)	Testosterone (ng/ml plasma)
Control	38.9 $\pm$ 7.2	2.98 $\pm$ 1.18
2	47.3 $\pm$ 9.3 *	0.98 $\pm$ 1.38 ***
4	41.8 $\pm$ 10.6	1.99 $\pm$ 2.11 **
6	36.3 $\pm$ 8.7	0.48 $\pm$ 0.46 ***

4-<sup>14</sup>C-テストステロン (specific activity 53.5 mCi/m mol. The Radiochemical Centre) 365,200 カウントを基質とし、NADPH 252 n moles, 間脳ホモジネート (蛋白質質量約 8 mg) 及び pH 6.8 リン酸塩緩衝液を加えて全量を 2.5 ml とし、38℃、2 時間インキュベートした。

\* P<0.05、\*\* P<0.02 及び \*\*\* P<0.001. (Student's t-test)、対照群と比較した。  
実験例数 = 9、実験値 = mean  $\pm$  s. d.

実験Ⅲにおいては、ラット間脳内 5 $\alpha$ -reductase 活性は無処置群と比較して四塩化炭素投与群で 54% (P<0.001) 減少した。そして血漿テストステロンは 54% (P<0.02) 減少した (表3)。

表3 慢性肝障害ラットの間脳内 5 $\alpha$ -reductase 活性と血漿テストステロン

	5 $\alpha$ -Reductase activity (pmoles/mg protein·2hr)	Testosterone (ng/ml plasma)
Control	26.3 $\pm$ 0.003	2.84 $\pm$ 1.24
Administration of CCl <sub>4</sub>	11.5 $\pm$ 7.0 **	1.32 $\pm$ 0.88 *

4-<sup>14</sup>C-テストステロン (specific activity 53.5 mCi/m mol. The Radiochemical Centre) 247,000 カウントを基質とし、NADPH 252 n moles, 間脳ホモジネート (蛋白質質量約 8 mg) 及び pH 6.8 リン酸塩緩衝液を加えて全量を 2.5 ml とし、38℃、2 時間インキュベートした。

\* P<0.02 及び \*\* P<0.001. (Student's t-test)、対照群と比較した。実験例数 = 8、実験値 = mean  $\pm$  s. d.

## 考 察

は乳動物の脳内には次のことからテストステロンが存在するものと考えられる。1) ラット脳を使用した *in vitro* の実験でテストステロンは  $\Delta^4$ -アンドロステンダイオンやダイヒドロテストステロンに変換する<sup>1, 11, 12)</sup>。2) ラットに<sup>3</sup>H-テストステロンを注射したら、脳内の特定部位に放射能が取り込まれ、主に<sup>3</sup>H-ダイヒドロテストステロンとして確認される<sup>13, 14)</sup>。3) テストステロンを代謝する酸素が存在する<sup>2, 3, 15, 16)</sup>。4) テストステロンに親和性を有するたんぱく質が存在する<sup>17, 18, 19)</sup>。しかし、現在の分析法では脳内にテストステロンが存在することを確認するのは不可能である。

そこで、標的器官においてテストステロンは活性型ダイヒドロテストステロンに変換することから、この変換に関係する酵素 5 $\alpha$ -reductase 活性を測定し、脳内テストステロン代謝

の指標とした。

前報<sup>5)</sup>で、副腎及び睪丸を剔除したラットにおいて術後3日まで脳内  $5\alpha$ -reductase 活性が増加し、この時期にテストステロンプロピオネートを投与した群は正常ラット群の活性値を示すが、ダイハイドロテストステロン投与群は手術ラットと同様の活性値を示すことを報告した。Massa ら<sup>17)</sup>は、睪丸剔除を行ったラットの脳下垂体前葉のホモジネートをテストステロンとインクベートし、テストステロンからダイハイドロテストステロンへの変換量が施術後2日目に増加し、この時期にテストステロンプロピオネートを投与するとダイハイドロテストステロンが低下すると報告している。

ヒトの肝硬変症において血中テストステロンが減少することから<sup>6,7)</sup>、ラットに四塩化炭素を用いて急性及び慢性肝障害を作製し、間脳内  $5\alpha$ -reductase 活性を測定した。実験Ⅰの2日注射後の経時変化をみると血漿テストステロンは3日目群を除いて有意の減少を示し、 $5\alpha$ -reductase 活性は1日目群で増加し、7日目群では減少している。肝臓の組織標本による肝障害の程度は2日注射後1日目群が一番激しく、経時とともに障害程度は軽くなっている。実験Ⅲにおいて、間脳内  $5\alpha$ -reductase 活性及び血漿テストステロンはいずれにおいても有意に低下している。慢性の肝障害時の間脳内  $5\alpha$ -reductase の低下は血漿テストステロンの変化に起因するものか、又は、血中エストラダイオールの増加のため脳内  $5\alpha$ -reductase 活性に対する競争的阻害によるものかははっきりしない。しかし、高坂ら<sup>20)</sup>はラットを用いた *in vitro* の実験でプロゲステロンは間脳内  $5\alpha$ -reductase 活性を阻害するが、エストラダイオールは阻害しないことを報告している。

ラットの肝臓障害時に間脳内  $5\alpha$ -reductase 活性に変化がみられることから、ヒトの肝硬変症においても脳内テストステロン代謝に変化があると考えるが脳内  $5\alpha$ -reductase 活性変化の生理的意義づけは不明である。

## 結 語

1. 雄ラットに四塩化炭素を2日間投与し、間脳内  $5\alpha$ -reductase 活性の経時変化を検討すると、四塩化炭素を投与後、1日目群で増加 ( $P < 0.05$ ) し、7日目群で減少 ( $P < 0.02$ ) した。血漿テストステロンは1日目群 ( $P < 0.001$ )、5日目群 ( $P < 0.01$ ) 及び7日目群 ( $P < 0.05$ ) で減少した。
2. 雄ラットに四塩化炭素を長期に投与した群では間脳内  $5\alpha$ -reductase 活性 ( $P < 0.001$ ) 及び血漿テストステロン ( $P < 0.02$ ) は減少した。

稿を終えるに臨み本研究の機会を与えてくださいました岡山大学医学部脳代謝研究施設長高坂睦年教授並びに本学赤木五郎学長に謝意を表します。また、肝臓の組織標本の分析をしてくださいました馬屋原病院の森久博司博士に感謝します。

なお、本論文の要旨の一部は昭和53年9月29日に第26回日本内分泌学会西部部会総会（広島市公会堂）において発表した。

## 文 献

- 1) L. J. Sholiton, R. T. Marnell, and E. E. Werk: *Steroids*, **8**, 265 (1966)
- 2) 金行孝雄: 日本内分泌学会誌, **50**, 1281 (1974)
- 3) 金行孝雄: 岡山医学会雑誌, **89**, 1 (1977)

- 4) 金行孝雄：岡山医学会雑誌，**89**，13（1977）
- 5) 金行孝雄：岡山医学会雑誌，**89**，1437（1977）
- 6) H. K. Kley, E. Nieschlag, W. Wieselach, W. Wiegelmann, H. G. Solbach and Kruskemper : *Acta endocr.*, (*kbb*) **79**, 275 (1975)
- 7) G. G. Gordon, J. Olivo, F. Rafii, and A. L. Southren : *J. clin. Endocrinol. Metab.*, **40**, 1018 (1975)
- 8) J. Schubert, and G. Sedvall : *Europ. J. Pharmacol.*, **17**, 75 (1972)
- 9) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 10) 二宮哲博, 石飛和幸, 引田 亨, 山藤靖展, 石川重二郎, 原田義道：ホルモンと臨床，**25**, 189 (1977)
- 11) 高坂睦年, 菊井 茂, 長尾堯司, 黒田正清, 野田昌子, 西崎美佐子, 金行孝雄, 吉田俊彦, 本森良治：神経化学，**7**, Supplement, **174** (1968)
- 12) L. J. Sholiton, and E. E. Werk : *Acta endocr.*, (*kbb*) **61**, 641 (1969)
- 13) M. Sar, and W. E. Stumpf : *Endocrinology*, **92**, 251 (1973)
- 14) J. Weisz, and C. Gibbs : *Neuroendocrinology*, **14**, 72 (1974)
- 15) R. B. Jaffe : *Steroids*, **14**, 483 (1969)
- 16) F. F. G. Rommerts, and H. J. van der Molen : *Biochem. Biophys. Acta*, **248**, 489 (1971)
- 17) R. Massa, E. Stupnicks, Z. Kniewald, and L. Martine : *J. Steroid Biochem.*, **3**, 385 (1972)
- 18) M. Monbon, B. Loras, J. P. Reboud, and J. Bertrand : *Brain Res.*, **53**, 139 (1973)
- 19) J. Barley, M. Ginsburg, B. D. Greestain, N. J. Maclusky, and P. J. Thomas : *Brain Res.*, **100**, 383 (1975)
- 20) 高坂睦年, 金行孝雄, 庄盛敏廉：日本内分泌学会誌，**52**, 1072 (1976)

昭和54年3月28日受理